

## Resumo

O linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) é a doença maligna linfoide mais comum, e apresentou um aumento significativo da sua incidência nos últimos 20 anos.

Os linfomas não Hodgkin (LNH) representam um grupo heterogêneo de neoplasias linfóides com diferentes apresentações, evoluções, prognósticos e tratamentos. Os LDGCB correspondem, dentro deste grupo, a neoplasias de células grandes e maduras, com uma grande taxa de proliferação.

A classificação deste tipo de tumores, que inicialmente se prendia apenas com a apresentação clínica e morfológica da doença, tem sofrido alterações e aperfeiçoamento ao longo dos tempos, passando a englobar os perfis moleculares e imunológicos. As descobertas obtidas através desta melhor categorização, provaram ser importantes fatores de prognósticos, e com maior aplicabilidade na escolha de terapêutica adequada.

Com esta dissertação, e apoiando-me num caso clínico de um paciente jovem com LDGCB do Serviço de Hematologia do Hospital de Santo António, pretendo explorar os novos desafios no tratamento destes linfomas e a importância da sua caracterização correta, e cada vez mais específica, uma vez que têm aplicabilidade na escolha e desenvolvimento de tratamentos.

## Abstract

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is the most common lymphoid malignancy, and shows a significant increase in incidence over the past 20 years.

The non-Hodgkin lymphomas (NHL) represent a heterogeneous group of lymphoid neoplasms with different presentations, evolution, prognosis and treatments. The DLBCL correspond, within this group, to the aggressive large and mature cell neoplasms, with a high rate of proliferation.

The classification of such tumors, which initially was linked only with the clinical and morphological presentation of the disease, has undergone change and improvement over time, expanding into the molecular and immunological profiles. The findings from this best categorization, proved to be more important predictors and have greater applicability in choosing appropriate therapy.

With this thesis, and supporting me in a clinical case of a young patient with DLBCL of the Hematology Department of Santo António's Hospital, I want to explore new challenges in the treatment of these lymphomas and the importance of correct characterization, and increasingly specific, since they have applicability in choosing and developing treatments.

**Palavras-chave:** LDGCB, paciente jovem, fatores prognósticos, terapêutica.

**Keywords:** DLBCL, young patients, prognostic factors, treatment.

## Abreviaturas

CA – Células Ativadas;  
 CAL – Contagem absoluta de Linfócitos;  
 CAM – Contagem Absoluta de Monócitos;  
 CG – Centro Germinativo;  
 CHOP – Ciclofosfamida, Doxorubicina, Vincristina e Prednisolona;  
 DHAP – Ciplastina, Citosina, Arabinosida e Dexametasona;  
 EBV – Vírus de Epstein Barr;  
 ECOG – Grupo cooperativo oncológico do Este (Eastern Cooperative Oncology Group);  
 ESHAP – Etoposido, Metilprednisolona, Citarabina, Cisplatina;  
 GEMOX – Gemcitabina, Oxaliplatina;  
 HBV – Vírus da Hepatite B;  
 HCV – Vírus da Hepatite C;  
 HIV – Vírus da imunodeficiência humana;  
 Hyper-CVAD – Ciclofosfamida, Vincristina, Adriamicina, e Dexametasona fracionadas;  
 IHQ – Imunohistoquímica;  
 IPI – Índice de Prognóstico Internacional;  
 IPIaa – Índice de Prognóstico Internacional ajustado à Idade;  
 LB – linfócitos B;  
 LDGCB – Linfoma Difuso de Grandes Células B;  
 LDGCB RR – Linfoma Difuso de Grandes Células B Refratário ou Recorrente;  
 LDH – Lactato desidrogenase;  
 LNH – Linfoma não Hodgkin;  
 LT – Linfócitos T;  
 OMS – Organização Mundial de Saúde;  
 PEG – Perfil de Expressão Genética;  
 PET – tomografia por emissão de positrões;  
 R-ACVBP – Rituximab, Ciclofosfamida, Doxorubicina, Bleomicina, Vindesina e Prednisolona;

R-CHOEP – Rituximab, Ciclofosfamida, Doxorubicina, Etoposido, Vincristina e Prednisolona;

R-CHOP – Rituximab, Ciclofosfamida, Doxorubicina, Vincristina e Prednisolona;

R-DHAP – Rituximab, Ciplastina, Citosina, Arabinosida e Dexametasona;

R-ICE – Rituximab, Ifosfamida; Carboplatina, Etoposido;

REAL – Classificação revista de neoplasias linfóides europeio-americana (*Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms*);

SNC – Sistema Nervoso Central;

TC – tomografia computadorizada.

## Introdução

O Linfoma Difuso de Grande Células B (LDGCB) é a 5ª causa mais comum de neoplasia, representando 31% de todos os Linfomas não Hodgkin (LNH)(1, 2). Tem uma incidência na Europa de 3 a 4 novos casos por 100 000 habitantes por ano (3). É uma neoplasia de células grandes, com um núcleo de tamanho duas vezes maior que um linfócito normal, com um padrão de crescimento difuso (4). Apresenta núcleos vesiculares, nucléolos proeminentes, citoplasma basófilo e um elevado grau de proliferação(1). É um tumor de apresentação heterogênea e agressiva, associado a um prognóstico reservado, com uma sobrevida média sem tratamento inferior a 1 ano(5).

A etiologia deste linfoma permanece desconhecida (1, 4). Dos fatores de risco para o desenvolvimento destes tumores contudo, fazem parte a imunodeficiência e outras alterações imunológicas, bem como fatores que predisõem à produção de anomalias moleculares (4, 5).

Pode tratar-se de uma doença de novo ou de uma transformação histológica de outro linfoma de células B de baixo grau, como o folicular ou o linfoma de pequenos linfócitos/leucemia linfocítica crônica (1, 4), sendo que os últimos têm um pior prognóstico(6).

A idade média de apresentação é a sétima década de vida (1), com manifestações tanto ganglionares como extraganglionares (até 40% dos casos) (1, 4). Os pacientes geralmente apresentam uma massa tumoral de crescimento rápido, sendo que cerca de 50% dos diagnósticos são feitos numa fase avançada da doença (4).

Os atuais princípios de classificação dos LDGCB foram estabelecidos em 1994 na

classificação europeio-americana revista de neoplasias linfóides (REAL), em que cada linfoma é definido pelo conjunto das suas características clínicas, morfológicas, fenótípicas, citogenéticas e moleculares (1). Segundo a classificação de 2008 da Organização Mundial de Saúde (OMS), é considerado uma neoplasia de células B maduras e está dividido em quatro variantes ou subgrupos (4)(tabela I).

Tabela I - Linfoma difuso de células B grandes: variantes e subgrupos (4)

Linfoma Difuso de Células B não especificado	
<b>Variantes morfológicas comuns</b>	Centroblástica
	Imunoblástica
	Anaplásica
<b>Variantes morfológicas raras</b>	
<b>Subgrupos moleculares</b>	Tipo células B de centro germinativo (CG)
	Tipo células B ativadas (CA)
<b>Subgrupos imunohistoquímicos</b>	LDGCB CD% positivo
	Tipo células B de centro germinativo (CG)
	Tipo não células B de centro germinativo (NCG)

Os LDGCB não especificados constituem o subtipo mais comum(1), no entanto heterogêneo, uma vez que envolvem os casos que não pertencem a nenhum subtipo específico por falta de critérios (4).

Histologicamente, os gânglios linfáticos apresentam, geralmente, uma proliferação difusa de linfócitos de grandes dimensões, que podem afetar total ou parcialmente a arquitetura normal dos gânglios (4).

Consistem numa mistura de centroblastos e imunoblastos com um número de figuras mitóticas elevado. Na maioria dos casos um dos citotipos, centroblastos ou imunoblastos, é predominante, representando mais de 90% da população celular (1). Nestes casos, o LDGCB passa a ser denominado *centroblástico* ou *imunoblástico*, respetivamente (1). Foi demonstrado que o subtipo imunoblástico, apesar de menos comum (4), representa um fator preditivo de diagnóstico negativo bastante fiável (1). Os linfócitos T (LT) reativos e histócitos são em número variável, no entanto nunca ultrapassam a contagem de linfócitos B (LB) (1).

O imunofenótipo destas células neoplásicas expressa antígenos próprios dos LB como CD19, CD22, CD79a e CD20, sendo o último importante como alvo da terapêutica com Rituximab (1, 4). O CD5 está normalmente expresso em casos que ocorrem de novo (4). A expressão de CD10, BCL6, e MUM1 é variável, mas depende da origem celular do tumor (4). Numa célula B de centro germinativo normal, a expressão de MUM1 (oncoproteína expressa em plasmócitos/células B prontas para diferenciação) e BCL6 é mutuamente exclusiva(7). No entanto, em 50% das células tumorais de LDGCB há uma co-expressão das duas proteínas, sugerindo uma

desregulação nas suas expressões (7). O MUM1, expresso em cerca de 70% destas neoplasias (8), parece ser um dos responsáveis pela génese tumoral, atuando como um fator de transcrição genética (7).

Atualmente, o perfil de expressão genético (PEG) consegue distinguir pelo menos dois grandes subtipos de LDGCB(1, 4, 9): o de centro germinativo (CG), que expressa marcadores CD10, LMO2, e BCL6, como nas células de centro germinativo normais; ou de células ativadas (CA) relacionado com a ativação de genes da via NF- $\kappa$ B (10), como BCL-2, MYC, MUM1, CD44, FLIP e ciclina D2 (11, 12).

Várias tentativas têm sido feitas para correlacionar os dados obtidos por PEG, usando técnicas mais acessíveis como a imunohistoquímica (IHQ)(13-15). Esta técnica pode ser realizada em amostras fixadas e permite distinguir entre linfomas de tipo CG e de tipo não CG(14). Diferentes algoritmos, como Hans, Colombo, Muris, Choi e Tally, foram criados, combinando a expressão de diversos antígenos(15). Estudos estão a ser feitos para prever qual será o melhor algoritmo de determinação de origem celular, e o mais recente, denominado de Tally, parece ter a melhor correlação com exames de microarray, mantendo o significado prognóstico (14). No entanto, o algoritmo de Hans (figura 1) continua a ser o mais utilizado devido à sua simplicidade e também elevado nível de concordância (10).

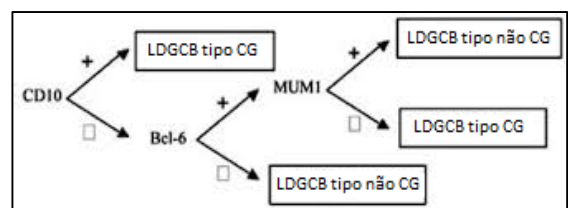


Figura 1 - Algoritmo de Hans(15)

Apesar de haver alguma associação significativa entre PEG e IHQ, nenhum dos algoritmos parece ser completamente fiável na criação de grupos molecularmente diferentes e com impacto prognóstico (12-15). Vários fatores podem contribuir para esta discrepância, por exemplo, a população em estudo e os métodos utilizados(13). Esta falha na correlação entre os dois métodos prova a necessidade de otimizar e estandardizar os procedimentos de IHQ(13), devendo ser praticados com cautela em ensaios clínicos onde o GEP não está disponível (13, 15).

O diagnóstico de LDGCB não pode ser estabelecido sem a análise histológica de uma amostra fixada, obtida por biópsia excisional do gânglio ou incisional de tecido extraganglionar (1, 3, 4, 6, 16).

O estadiamento utilizado para estes linfomas foi proposto em 1971 na Conferência de Ann Arbor, com as posteriores modificações de Cotswolds (tabela II) (1, 3, 4, 6, 16).

Uma história clínica e exame físico cuidadosos são métodos importantes na avaliação inicial do doente(6). Ao exame físico deve-se avaliar o crescimento de todos os gânglios linfáticos, notando o seu local e tamanho, inspecionando o anel de Waldeyer e a pele, avaliando a presença de hepatoesplenomegalia, e detetando massas. A presença de sintomas B (perda ponderal >10% em 6 meses; febre >38°C por pelo menos 3 dias consecutivos; e suores noturnos) deve ser pesquisada, bem como outros sintomas específicos de locais de envolvimento de doença(1, 6, 17). Deve também ser efetuada uma avaliação da performance do paciente através da escala do Grupo de cooperação oncológico do Este (ECOG) (tabela III)(1, 3, 6).

A nível analítico devem pesquisar-se os parâmetros hematológicos, e bioquímicos avaliando as funções renais e hepáticas e especialmente os valores de lactato desidrogenase (LDH)(6).

Tabela II - Estadiamento de Ann Arbor Modificado

Estadio	Definição
I	Envolvimento de uma única região ganglionar ou de um único local extraganglionar
II	Envolvimento de duas ou mais regiões ganglionares, ou envolvimento de uma região linfática e de um local extraganglionar, do mesmo lado do diafragma
III	Envolvimento de regiões linfáticas de ambos os lados do diafragma, com ou sem envolvimento do baço, ou de um local extraganglionar regional.
IV	Envolvimento, não contínuo de um ou mais locais extraganglionares, com ou sem envolvimento do sistema linfático.
Anotação	Definição
A	Sem sintomas B
B	Com pelo menos 1 dos sintomas B nos últimos 6 meses
X	Doença maciça
E	Extensão a pelo menos um órgão extraganglionar adjacente ao local de envolvimento
S	Baço

Tabela III - Escala de performance ECOG

Descrição	
<b>0</b>	Completamente ativo; capaz de realizar todas as suas atividades sem restrição.
<b>1</b>	Restrição às atividades físicas rigorosas; é capaz de trabalhos leves e de natureza sedentária.
<b>2</b>	Capaz de realizar todos os auto-cuidados, mas incapaz de realizar qualquer atividade de trabalho; em pé aproximadamente 50% das horas em que o paciente está acordado.
<b>3</b>	Capaz de realizar somente auto-cuidados limitados, confinado ao leito ou cadeira mais de 50% das horas em que o paciente está acordado.
<b>4</b>	Completamente incapaz de realizar auto-cuidados básicos, totalmente confinado ao leito ou à cadeira.

Citologia do líquido cefalorraquidiano pode ser pedida na suspeita de envolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC)(3, 6). Esta suspeita é mais pertinente quando há atingimento de locais específicos como testículo, nasofaringe, medula óssea, valores elevados de LDH, hipoalbuminemia, idade superior a 60 anos e doença extensa(16).

Imagiologicamente todos os candidatos a terapêutica devem ter pelo menos uma Tomografia Computorizada (TC) toraco-abdomino-pélvica. A tomografia de emissão de posições (PET) é agora utilizada como exame de estadiamento, uma vez que permite delinear com mais rigor a extensão da doença(3), bem como avaliar a resposta ao tratamento (16). Uma PET negativa tem um grande impacto na previsão de

progressão livre de doença e sobrevivência(5, 16, 18).

## Fatores prognósticos

### Score IPI

Apesar de definido há mais de 20 anos, o prognóstico destes doentes ainda nos é fornecido pelo índice de prognóstico internacional (IPI) (tabela 3) (3). Este índice utiliza cinco fatores de risco clínicos: 1) idade superior a 60anos; 2) níveis séricos de LDH elevados; 3) ECOG igual ou superior a 2; 4) estadio III ou IV de Ann Arbor; 5) mais de um local de doença extraganglionar(19).

Para doentes jovens, com menos de 60 anos, o índice prognóstico foi revisto, para uma versão simplificada do mesmo, o IPI ajustado à idade (IPIaa) em que são contabilizados os seguintes fatores: 1) níveis séricos de LDH elevados; 2) estadio III ou IV de Ann Arbor; 3) ECOG igual ou superior a 2(20).

Por cada fator que o doente tenha é atribuído 1 ponto e a soma de todos corresponde ao valor do score IPI (tabela IV).

Tabela IV - Grupos de risco IPI com percentagem sobrevivência a 5 anos na era pré-Rituximab (5)

IPI		
Score	Grupo de Risco	Sobrevivência a 5 anos (%)
0-1	Baixo	73
2	Intermédio-baixo	51
3	Intermédio-alto	43
4-5	Alto	26



IPlaa		
Score	Grupo de Risco	Sobrevivência a 5 anos
0	Baixo	83
1	Intermédio-baixo	69
2	Intermédio-alto	46
3	Alto	32

Apesar de ser a melhor estratégia de estratificação de risco, o IPI score ainda não consegue prever rigorosamente a evolução deste linfoma que é clinicamente tão diferente(20). Vários aperfeiçoamentos têm sido feitos(19), no entanto, não mostraram capacidade de estratificação prognóstica, desde a introdução de Rituximab, principalmente todos os scores acima de 3, que passam a fazer parte do mesmo grupo de risco (tabela V) (5, 19).

Tabela V - IPI Revisto após a introdução de Rituximab no tratamento(5)

Score	Grupo de Risco	Sobrevivência a 4 anos (%)
0	Muito Bom	94
1, 2	Bom	79
3 - 5	Mau	55

Vários parâmetros, que não são considerados neste score, têm especial importância na identificação de linfomas agressivos e subclassificados. Assim, recentemente têm sido feitos esforços para determinar quais as características biológicas, com valor prognóstico, que permitem uma

classificação mais correta, e uma terapêutica mais ajustada (21).

### Perfil genético

A expressão genética permitiu trazer alguma clareza a algumas categorias diagnósticas previamente incertas(9, 22). Ainda assim, persistem dúvidas sobre quais marcadores genéticos são mais importantes e responsáveis pelas diferenças nas respostas terapêuticas (15). Há também alguma heterogeneidade clínica que ainda não é explicada pela presente classificação. Estudos mostraram que o subgrupo de CG, tinha uma sobrevivência a 5 anos pior e estatisticamente significativa (16% vs 76%), independentemente da terapêutica com antraciclinas, e estava relacionado com o IPI elevado. Em relação ao prognóstico associado ao uso de imunoquimioterapia os resultados ainda não estão esclarecidos, apesar de aparentemente também não existirem diferenças.

Assim o perfil genético mostra-se importante não só por interesses académicos mas também na prática clínica. No entanto, este método de classificação é caro e difícil de aplicar, sendo ainda apenas considerado para investigação. Pode ser promissor no desenvolvimento de novos fármacos, com foco em moléculas tradutoras de sinal genético das células tumorais, e que promovem o crescimento das mesmas.

Imunofenotipicamente, apesar de nenhum dos algoritmos ter mostrado valor prognóstico, diversos biomarcadores mostraram ser importantes na determinação do comportamento do tumor em LDGCB (tabela 5).

**BCL-6**

A proteína de expressão BCL-6, um marcador das células derivadas de centro germinativo, foi identificada no passado como sendo um dos fatores preditivos mais fortes em LDGCB (21). A expressão de BCL-6 prevê um prognóstico relativamente favorável em pacientes tratados com antraciclinas. Estudos mostraram que este fator preditivo era menor com a inclusão de Rituximab na quimioterapia, porque, apesar deste esquema de tratamento mostrar melhores resultados globais, parece ser mais eficaz em células BCL-6 negativas (21). No entanto, estudos mais recentes não vieram confirmar estes achados e mostraram que esta proteína é de difícil pesquisa e está associada aos dois subtipos celulares de linfoma, não sendo restrita a CG (13).

**BCL-2**

O BCL-2 é uma proteína anti-apoptótica, importante no normal desenvolvimento e diferenciação de LB(2, 21), sendo que a sua sobre expressão foi reportada em cerca de 40 a 60% dos LDGCB(2) e associada a um pior prognóstico (2). Com a introdução de Rituximab deixou de haver correlação significativa entre a expressão de BCL-2 e a taxa de sobrevivência. Entretanto, estudos mais recentes mostram, novamente, existir um valor prognóstico para a expressão de BCL-2, mas somente no subtipo de CG. Estas diferenças podem ser explicadas pela diversidade nos mecanismos que levam à expressão desta proteína. No linfoma de CG, a hiperexpressão é devida, quase na sua totalidade, a uma translocação t(14,18), à qual o BCL-2 está justaposto, e que não é resolvida pelo R. Já para o subtipo de CA, o aumento desta proteína deve-se a uma ativação da via NF-κB, que por sua vez

pode ser inibida por Rituximab (2), vindo este fármaco contribuir para uma amenização do impacto negativo desta proteína neste subtipos (10).

**MYC e double-hit MYC/BCL-2**

A hiperexpressão da proteína MYC, responsável por promoção crescimento e proliferação celular (2, 23), está associada a um pior prognóstico (11, 23), e poderá ser também um fator preditivo do envolvimento de doença no SNC. A sobrevivência de pacientes com LDGCB que apresentam alteração no gene MYC está significativamente diminuída, e também apenas 31% dos portadores da mutação, estão livres de doença aos 5 anos(10). Estes resultados são independentes do IPI. No entanto não está claro se esta diferença de valores se deve singularmente à alteração de expressão de MYC ou à sua associação com os genes BCL-2 (2).

Há consenso geral de que os chamados LDGCB double-hit (que têm os genes MYC e BCL2 afetados por translocação t(14,18)) têm um comportamento clínico muito mais agressivo(2, 11) (associados a IPI mais elevado, LDH elevada, envolvimento medular e do SNC). Têm uma esperança média de vida de apenas 8 meses, e representam cerca de 5% a 10% dos LDGCB (2). Apesar disto, foi mostrada a discrepância entre o tipo de origem celular e o comportamento clínico tumoral (11), uma vez que os linfomas com double-hit estão mais associados a LDGCB de CG, que é um subtipo celular menos agressivo. Estudos mais recentes propuseram que talvez a expressão proteica, de MYC e BCL-2, que ocorre em 20-30% dos casos de LDGCB(10), não fossem apenas derivados da translocação t(14,18) (10) e tivessem um papel mais importante



e fiável a nível prognóstico que as respetivas expressões genéticas. Na realidade um estudo provou que a co-expressão de MYC e BCL2 estava associada a um pior prognóstico e também mais presente no linfoma de células B ativadas. Esta análise sugere, inclusive, que talvez seja esta co-expressão das duas proteínas, neste subtipo de LDGCB, que lhe confere um pior prognóstico(11). Doentes com este tipo de alterações parecem poder beneficiar de tratamento com quimioterapia mais intensiva(10, 11, 24).

### P53

Também uma mutação no gene TP53, um gene supressor tumoral multifuncional(2), mostrou ser um biomarcador de mau prognóstico para linfomas de novo(25, 26), e ocorre em 1 de cada 5 casos. Este parece ser um marcador independente do perfil genético presente, estando já provado o seu valor na era pré Rituximab (26). Estudos recentes também mostraram que mais de 50% das células tumorais expressando a proteína p53, representam um pior prognóstico, mesmo em tratamentos com imunoquimioterapia (26).

A ausência de expressão de proteína p21 (proteína pró-apoptótica), concomitantemente à presença de p53, está também associada a uma diminuição na sobrevivência em pacientes com LDGCB de CG (10). A expressão de p21 é regulada pela proteína p53 que por sua vez está associada a BCL6. Estas interações são complexas e uma investigação mais aprofundada das mesmas pode contribuir para uma melhor compreensão da heterogeneidade desta doença (10).

Tabela VI - Exemplos de biomarcadores e seu impacto prognóstico em LDGCB tratado com R-CHOP(2)

Biomarcador	Impacto prognóstico
BCL-6	Bom
BCL-2	Mau em CG
MYC	Mau (em conjunto com BCL-2)
LMO2	Bom
P53	Mau
VEGFR2	Mau
HIF-1	Bom
Ki-67	Mau
P21	Bom
Densidade microvascular	Mau
CD5	Mau
Indoleamina 2,3-dioxigenase	Mau
Skp2	Mau

### Microambiente

O microambiente no qual o tumor se encontra representa um importante fator na patogénese e comportamento clínico dos linfomas malignos. Foi demonstrado que a uma baixa contagem absoluta de linfócitos (CAL) e uma alta contagem absoluta de monócitos (CAM) estão associados a uma menor sobrevivência (10, 27-29). Estudos mostraram que o rácio linfócitos/monócitos com um cut-off de CAL menor ou igual a 1000/ml e de CAM maior ou igual a 630/ml, contribuem para um tumor clinicamente agressivo, com uma sobrevivência global menor, bem como uma menor sobrevida livre de doença (10). Este rácio também mostrou conseguir identificar grupos de alto risco, mesmo para IPIs baixos ou intermédios(10).

Alterações morfológicas de monócitos, com uma expressão diminuída de HLA-DR estão associados a uma doença mais agressiva, de estadio mais avançado e progressão mais rápida(10).

Também a presença de cadeias livres de imunoglobulinas mono ou policlonais, que ocorre em 32% dos diagnósticos de LDGCB, está associada a uma menor sobrevivência livre de doença (10). Este método, uma vez que já se encontra disponível e estandardizado, parece uma ferramenta atrativa em follow-up, uma vez que permite monitorizar a resposta a terapêutica, deteção de doença residual e recidivas e também acrescenta valor preditivo de prognóstico ao IPI(10).

Outro fator que contribui para a diferenciação celular de células B, proliferação, angiogénese e apoptose é a vitamina D. Já está provado que em LNH, valor baixos desta vitamina estão associados a piores prognósticos. Em LDGCB, tratados com imunoquimioterapia, a deficiência desta proteína mostrou diminuir a resposta ao tratamento, possivelmente por diminuir a capacidade de toxicidade celular do R sem a sua presença(10).

Outra condicionante ambiental, nestes tumores, é a presença de citocinas alteradas. Estas pequenas proteínas tem um papel na ativação de células B, na proliferação e apoptose celular, bem como na regulação imune, e ainda não se sabe se a sua alteração em LDGCB, é uma causa ou é causada pelo tumor(10). Apesar disto, a sua presença relaciona-se uma sobrevivência e progressão livre de doença menores(10).

## Tratamento

Nos dias de hoje, o tratamento de primeira linha deste linfoma é largamente aceite como sendo feito através de R-CHOP (Rituximab, Ciclofosfamida, Doxorrubicina, Vincristina e Prednisolona) (3, 16). Contudo, apresenta algumas especificidades dependendo da idade de apresentação, e no que diz respeito a pacientes mais jovens a escolha terapêutica depende do score IPIaa. Segundo a ESMO, para pacientes jovens, com risco intermédio baixo, ou baixo mas com doença maciça, as indicações são de seis ciclos de CHOP com 6 doses de Rituximab a cada 21 dias, tal como para doença de baixo risco prognóstico (IPIaa=0). No entanto, para estes scores mais elevados segue-se consolidação com radioterapia no local da massa ou mais dois ciclos de R-CHOP. Pode também ser usado um esquema de quimioterapia mais intensiva com R-ACVBP (Rituximab, Doxorrubicina, Vindesina, Ciclofosfamida, Bleomicina e Prednisolona). Se se tratasse de um doente jovem, mas com um risco elevado a opção terapêutica já seria de 6 a 8 ciclos de CHOP, com 8 doses de R, ou então regimes mais agressivos com R-CHOEP (Rituximab, Ciclofosfamida, doxorrubicina, Etoposido, Vincristina e Prednisolona) ou então R-ACVBP seguida de transplante autólogo de células progenitoras hematopoiéticas. (3, 16)

Alguns locais extraganglionares de manifestação da doença exigem uma consideração terapêutica especial. No caso de envolvimento do SNC (Sistema Nervoso Central), ou prevenção do mesmo é necessário administrar ao doente altas doses de Metotrexato e de Citarabina(6, 16, 30).

## Apresentação do caso

Homem de 51 anos foi admitido em 19/02/2013 no Serviço de Hematologia do Hospital de Santo António, Centro Hospitalar do Porto (CHP), devido a uma massa axilar direita dolorosa e incapacitante, de crescimento rápido e progressivo, com 5 semanas de evolução, sem outras queixas, incluindo febre, perda ponderal, hipersudorese ou astenia. Não apresentava antecedentes pessoais relevantes, nem medicação habitual.

Ao exame objetivo a massa era dura, e dolorosa ao toque, com aproximadamente 13cm. Encontrava-se aderente aos planos profundos, e com sinais inflamatórios locais, incluindo edema dos tecidos adjacentes. Não foram detetadas outras adenopatias ou hepatoesplenomegalia.

Analicamente apresentava hemograma com leucócitos 10330/uL (6740 neutrófilos/uL, 2600 linfócitos/uL e 830 monócitos/uL), hemoglobina 17 g/dL e plaquetas 347 000/uL, sem alterações morfológicas aparentes. Ao exame bioquímico, não apresentava alterações da função renal ou de enzimas hepáticas, apenas uma elevação ligeira da LDH (253 U/L). Exames serológicos para HIV, HBV e HCV foram negativos.

Fez biópsia excisional cujo resultado histológico determinou o diagnóstico de linfoma B não Hodgkin, de grande células, com áreas de tipo imunoblástico. A análise IHQ mostrou positividade das células neoplásicas para CD20 e CD79a e negatividade CD3 e EBV.

A TC toraco-abdomino-pélvico, mostrou uma volumosa massa tumoral axilar direita (13x7,5x13,5 cm) e um conglomerado

adenopático na vizinhança da massa tumoral (2,5cm), sem outros achados relevantes.

A biópsia de medula óssea revelou não haver sinais de infiltração por linfoma, e uma densidade celular normal.

Tratava-se de um Linfoma difuso de grandes Células B não específico, de tipo imunoblástico. O paciente apresentava um estadio I de Ann Arbor, com doença maciça, mas sem envolvimento extraganglionar, com ECOG 1, determinando um IPIaa de 1, correspondente a linfoma de risco intermédio baixo.

A 24/02 iniciou tratamento de quimioterapia com esquema R-CHOP. Este decorreu sem intercorrências, com resposta do doente ao mesmo, havendo redução da massa tumoral, diminuição da inflamação local e do edema do membro superior, e desaparecimento da dor.

Aproximadamente dois meses depois, após o 3º ciclo de R-CHOP, referiu ressurgimento da dor, de grande intensidade e que o impedia de dormir (9 em 10 na escala da dor) e que apenas cedia parcialmente ao uso de opióides. Verificou-se aumento da tumefação nessa região, bem como aparecimento de uma massa na região inguinal direita. Realizou-se nova TC toraco-abdomino-pélvica que revelou: uma extensa massa axilar direita, tendo 12 cm de diâmetro e áreas de necrose dispersas; adenopatias isoladas menores de 19mm no cavado axilar esquerdo; adenomegalia com 4,9 cm na região inguinal direita e formação ganglionar ovalada com 26mm na região inguinal esquerda. Apresentava sinais de doença agressiva e refratária a tratamento.

Por se tratar de um doente jovem, sem comorbilidades e com boa condição geral, foi reconsiderada nova orientação terapêutica, com esquema de ESHAP (Etoposido,

Metilprednisolona, Citarabina, Cisplatina), que iniciou a 03/05/2013. O tratamento decorreu sem complicações, até ao 18º dia do 1º ciclo, em que se verifica progressão da doença com aumento da lesão axilar, edema e dor. Foi decidida alteração para terapêutica mais intensiva com Hyper CVAD (Ciclofosfamida, Vincristina, Adriamicina, e Dexametasona fracionadas), a qual iniciou a 6/06. Realizou Punção Lombar e TC cerebral que negaram qualquer envolvimento.

No dia +8 após quimioterapia, foi internado na Unidade de Cuidados Intensivos Médicos por neutropenia febril e sépsis por E.coli. No dia 22/06 (ao 16º dia pós quimioterapia), houve novamente progressão da doença e decidiu-se utilizar nova linha terapêutica, segundo protocolo GEMOX (Gemcitabina, Oxaliplatina), que iniciou dia 2/07, e não surtiu qualquer efeito. Dia 4/07 o doente continuava com dor muito intensa do MSD (grau 9), tendo feito uma trombose superficial da veia basílica, e posteriormente apresentou parestesias e diminuição da força muscular, por provável infiltração do plexo braquial.

Tendo em conta a evolução clínica foi explicada a família e ao doente a gravidade da situação, e o facto de a doença ser refratária a todos os tratamentos instituídos. Iniciou medidas de conforto, vindo a falecer a 19/07/2013 no CHP-Hospital de Santo António.

## Discussão

Tal como no caso acima descrito, um linfoma com baixo risco atribuído, pode revelar-se um tumor agressivo e não responder bem à terapêutica, tendo uma sobrevida de poucos meses.

Cerca de 10% dos pacientes com esta doença vão mostrar ser refratários ou resistentes ao tratamento, tal como no caso acima. Também mais de 30% dos LDGCB vão recidivar. O LDGCB refratário/resistente à terapêutica ou recidivante (LDGCB RR) é muito difícil de tratar e as opções terapêuticas são limitadas(31). Está também associado a um pior prognóstico, sendo a esperança média de vida de apenas 3 ou 4 meses(32). De acordo com as guidelines da ESMO, nestes casos, devemos primeiro avaliar se o doente é ou não elegível para transplante autólogo de células progenitoras hematopoiéticas (31). Se o paciente for quimiossensível, ao tratamento de resgate feito com R-DHAP (Rituximab, Ciplastina, Citosina, Arabinosida, e dexametasona) ou R-ICE (Rituximab, Ifosfamida, Carboplatina e Etoposida), e reunir todas as condições clínicas, é elegível para transplante (3, 32, 33). Também pode ser utilizado o esquema quimioterápico ESHAP(34), como ocorreu no caso apresentado.

Um estudo de fase dois, denominado CORAL, procurou perceber se existiam diferenças na resposta ao tratamento com R-DHAP e R-ICE(32). Não se verificaram diferenças na sobrevida geral entre as duas terapêuticas, no entanto, uma melhoria na análise a este estudo revelou que em LDGCB de centro germinativo a resposta era melhor com R-DHAP em relação a R-ICE (32). Outros estudos mostraram que o resultado de terapêutica com ESHAP é semelhante ao de DHAP, ou outros esquemas quimioterápicos de base platínium.

Apesar das diferenças em relação à resposta terapêutica os subtipos moleculares de células B ativadas e de centro germinativo não parecem mostrar relevância prognóstica quando a

doença é recorrente ou refratária. Recidivas com menos de um ano e scores de IPIaa altos na reavaliação da doença determinam um risco mais elevado. O facto de se tratar de um tumor refratário ou resistente ao tratamento, e de ter sido feita terapêutica prévia com Rituximab, determinam uma pior resposta a terapêutica (31, 32).

Se o paciente tiver uma segunda recaída após transplante autólogo, considerar transplante alogénico, esquemas de quimioterapia e/ou radioterapia paliativos ou a inclusão do paciente em ensaios clínicos de novos fármacos.(3)

No caso descrito a doença mostrou-se refratária, à terapêutica com R-CHOP, após o final do 3º ciclo. Passou assim a considerar-se este caso como um LDGCB RR. Cumpria os critérios de elegibilidade para transplante e assim iniciou terapêutica com ESHAP, sem R, uma vez que este fármaco se tinha mostrado ineficaz em tratamento de 1ª linha. No entanto, o paciente mostrou ser igualmente resistente a este novo protocolo de quimioterapia, progredindo novamente pouco tempo depois. Desta maneira, apesar de altamente improvável, mas atendendo à excelente condição geral e idade do paciente, foi considerado outro esquema de tratamento mais intensivo, com Hyper C-VAD, utilizado mais comumente em tratamento de LNH muito agressivos como é o caso do Linfoma de Burkitt e Leucemia Linfocítica Aguda. Este esquema tem uma grande toxicidade e provoca mielossupressão. Na ausência de resposta, recorreu-se a última linha terapêutica com GEMOX, com o objetivo paliativo.

Na atualidade, os fatores clínicos são limitados na sua habilidade para identificar pacientes em que se justifique a implementação

de terapêuticas mais agressivas, como seria o caso do doente analisado anteriormente. Na prática clínica não existem muitos marcadores biológicos que permitam o aconselhamento de decisão aquando da terapêutica inicial. Tal como já foi acima mencionado o reconhecimento da heterogeneidade molecular do LDGCB(35) é de extrema importância para o desenvolvimento novos fármacos que melhorem a resposta destes tumores a terapêuticas convencionais(36, 37).

Uma proteína cinase C beta foi identificada por PEG como um possível alvo para tratamento de LDGCB. O Enzastaurin, um potente inibidor desta proteína, foi testado num estudo multicêntrico de fase II, e mostrou que este fármaco é bem tolerada em pacientes com doença refratária ou recorrente(5, 10).

Outro alvo identificado por PEG foi um recetor de células B, responsável por mediar sinais de sobrevivência, e que pode ser bloqueado por Fostamatinib Disódio (inibidor da tirosina cinase), induzindo a apoptose de linhas celulares presentes em linfomas de células B(2, 5, 10).

Também o bortezomib, já aprovado para uso em linfomas do manto recorrentes, parece ter atividade no subtipo de CA, através sua inativação da via NF-kB (1, 2, 5, 10).

No que respeita a novos agentes para primeira linha no tratamento de LDGCB anticorpos monoclonais e fármacos imunomoduladoras parecem ser o caminho mais promisso(20)r. No que respeita as células B o CD20 continua a ser o alvo-antígeno mais apropriado. Assim novos anticorpos anti CD20 têm sido pesquisados, com uma maior eficácia que o Rituximab: aumentando a capacidade de morte celular direta e de citotoxicidade



dependente do anticorpo (20). O anticorpo Obinutuzumab já mostrou em estudos uma capacidade de morte celular maior do que o Rituximab, havendo já ensaios clínicos, abertos a novas inclusões que estudam a quimioterapia associada ao Rituximab vs quimioterapia associada a Obinutuzumab. Já foi recomendado a sua aprovação para uso europeu e norte-americano, em 2014, para tratamento de Leucemia Linfocítica Crônica(38), dando esperança para que em breve seja utilizado em LDGCB.

No que respeita a fármacos imunomoduladores a Lenalidomida, um derivado da talidomida, mostrou resultados promissores no tratamento de LNH, através da melhoria das capacidades antitumorais das células NK e alterando o balanço entre citocinas pro e anti-inflamatórias(39). Estudos recentes parecem mostrar ainda que a Lenalidomida apresenta resultados fiáveis e seguros, quando administrada com R-ICE em terapêutica de resgate para LDGCB RR, tendo um efeito sinérgico com o Rituximab (39). No entanto mais estudos devem ser feitos, em populações maiores, com riscos mais elevados e comparada com a expressão de biomarcadores.

## Conclusão

Em suma, apesar de todas as evoluções na classificação do LDGCB, e dos progressos para a avaliação prognóstica nesta doença, a verdade é que ainda nenhum tem valor preditivo 100% fiável. Estudos continuam a ser feitos nesta área uma vez que novas descobertas podem levar a melhor entendimento dos mecanismos fisiopatológicos desta doença, e que poderão representar novos alvos terapêuticos.

Atualmente, apenas 40% dos pacientes respondem favoravelmente à terapêutica, e ainda não há dados prognósticos que suportem um desvio do tratamento dos padrões normais de R-CHOP(24). Contudo, a resistência à terapêutica, em LDGCB RR, é responsável por uma má evolução dos doentes, independentemente do grupo de risco que lhes foi atribuído. Desta maneira, concomitantemente a novos modelos prognósticos e novos fármacos devem ser descobertos métodos para avaliar a capacidade de resposta da neoplasia ao tratamento, de maneira a podermos estimar melhor a evolução do tumor e decidir as estratégias terapêuticas mais corretas.



## Bibliografia

1. Martelli M, Ferreri AJM, Agostinelli C, Rocco AD, Pfreundschuch M, Pileri SA. Diffuse large B-cell Lymphoma. *Critical Reviews in Oncology Hematology*. 2013;87:146-71.
2. Sehn LH. Paramount prognostic factors that guide therapeutic strategies in diffuse large B-cell lymphoma. *Hematology*. 2012.
3. Tilly H, Vitolo U, Walewski J, da Silva MG, Shpilberg O, André M, et al. Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2012;23 Suppl 7:vii78-82.
4. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. Diffuse Large B-cell Lymphoma Not Otherwise Specified. In: Saúde OMD, editor. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues* 2008.
5. Flowers CR, Sinha R, Vose JM. Improving Outcome for Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *CA Cancer Journal Clinic*. 2010;60(6).
6. Armitage JO. How I treat patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2007;110(1):29-36.
7. Falini B, Fizzotti M, Pucciarini A, Bigerna B, Marafioti T, Gambacorta M, et al. A monoclonal antibody (MUM1p) detects expression of the MUM1/IRF4 protein in a subset of germinal center B cells, plasma cells, and activated T cells. *Blood*. 2000;95(6):2084-92.
8. Tsuboi K, Iida S, Inagaki H, Kato M, Hayami Y, Hanamura I, et al. MUM1/IRF4 expression as a frequent event in mature lymphoid malignancies. *Leukemia*. 2000;14(3):449-56.
9. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403(6769):503-11.
10. Vaidya R, Witzig TE. Prognostic factors for diffuse large B-cell lymphoma in the R(X)CHOP era. *Ann Oncol*. 2014.
11. Hu S, Xu-Monette ZY, Tzankov A, Green T, Wu L, Balasubramanyam A, et al. MYC/BCL2 protein coexpression contributes to the inferior survival of activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: a report from The International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program. *Blood*. 2013;121(20):4021-31; quiz 250.
12. Tirado CA, Chen W, Garcia R, Kohlman KA, Rao N. Genomic profiling using array comparative genomic hybridization define distinct subtypes of diffuse large b-cell lymphoma: a review of the literature. *Journal of Hematology and Oncology*. 2012;5(54).
13. Coutinho R, Clear AJ, Owen A, Wilson A, Matthews J, Lee A, et al. Poor concordance among nine immunohistochemistry classifiers of Cell-of-origin for Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Implication for Therapeutic Strategies. *Clinical Cancer Research*. 2013.
14. Meyer PN, Fu K, Greiner TC, Smith LM, Delabie J, Gascoyne RD, et al. Immunohistochemical Methods for Predicting Cell of Origin and Survival in Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated with Rituximab. *Journal of Clinical Oncology*. 2011.
15. Gutiérrez-García G, Cardesa-Salzmänn T, Climent F, González-Barca E, Mercadal S, Mate JL, et al. Gene-expression profiling and not immunophenotypic algorithms predicts prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *BLOOD*. 2011;117(18).
16. Armitage JO. My treatment approach to patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Mayo Clin Proc*. 2012;87(2):161-71.
17. Ghielmini M, Vitolo U, Kimby E, Montoto S, Walewski J, Pfreundschuh M, et al. ESMO Guidelines consensus conference on malignant lymphoma 2011 part 1: diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), follicular lymphoma (FL) and chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Ann Oncol*. 2013;24(3):561-76.
18. Nols N, Mounier N, Bouazza S, Lhommel R, Costantini S, Vander Borght T, et al. Quantitative and qualitative analysis of metabolic response at interim positron emission tomography scan combined with International Prognostic Index is highly predictive of outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2014;55(4):773-80.
19. Zhou Z, Sehn LH, Rademaker AW, Gordon LI, Lacasce AS, Crosby-Thompson A, et al. An enhanced International Prognostic Index (NCCN-IPI) for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the rituximab era. *Blood*. 2014;123(6):837-42.
20. Karlin L, Coiffier B. Improving survival and preventing recurrence of diffuse large B-cell lymphoma in younger patients: current strategies and future directions. *Onco Targets Ther*. 2013;6:289-96.

21. Winter JN. Prognostic Markers in Diffuse Large B-cell Lymphoma: Keys to the Underlying Biology. *Current Hematologic Malignancy Reports*. 2007;2.
22. Klapper W, Kreuz M, Kohler CW, Burkhardt B, Szczepanowski M, Salaverria I, et al. Patient age at diagnosis is associated with the molecular characteristics of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2012;119(8):1882-7.
23. Zhou M, Wang J, Ouyang J, Xu JY, Chen B, Zhang QG, et al. MYC protein expression is associated with poor prognosis in diffuse large B cell lymphoma patients treated with RCHOP chemotherapy. *Tumour Biol*. 2014.
24. Montes-Moreno S, Batlle A, Villambrosia SGd, Sanchez-Espiridion B, Cereceda L, Gonzalez-Barca E, et al. Risk adapted high dose and dose-dense therapies modulate the impact of biological classification in diffuse large B cell lymphoma prognosis. *Haematologica*. 2014.
25. Xie Y, Bulbul MA, Ji L, Inouye CM, Groshen SG, Tulpule A, et al. p53 expression is a strong marker of inferior survival in de novo diffuse large B-cell lymphoma and may have enhanced negative effect with MYC coexpression: a single institutional clinicopathologic study. *Am J Clin Pathol*. 2014;141(4):593-604.
26. Xu-Monette ZY, Wu L, Visco C, Tai YC, Tzankov A, Liu W-m, et al. Mutational profile and prognostic significance of TP53 in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP: report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *BLOOD*. 2012;120(19).
27. Wei X, Huang F, Wei Y, Jing H, Xie M, Hao X, et al. Low lymphocyte-to-monocyte ratio predicts unfavorable prognosis in non-germinal center type diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Res*. 2014;38(6):694-8.
28. Rambaldi A, Boschini C, Gritti G, Delaini F, Oldani E, Rossi A, et al. The lymphocyte to monocyte ratio improves the IPI-risk definition of diffuse large B-cell lymphoma when rituximab is added to chemotherapy. *Am J Hematol*. 2013;88(12):1062-7.
29. Watanabe R, Tomita N, Itabashi M, Ishibashi D, Yamamoto E, Koyama S, et al. Peripheral blood absolute lymphocyte/monocyte ratio as a useful prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era. *Haematology*. 2013;92(3).
30. Krmek DZ, Ljubić N, Vrbanić L. [Isolated central nervous system relapse of diffuse large B-cell lymphoma in the era of immunochemotherapy]. *Acta Med Croatica*. 2012;66(5):403-7.
31. Lukenbill J, Hill B. Relapsed/Refractory Diffuse large B-cell Lymphoma: Review of the Management of Transplant-Eligible Patients. *Leukemia and Lymphoma*. 2014.
32. Raut LS, Chakrabarti PP. Management of relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma. *South Asian Journal of Cancer*. 2014;3(1):66-70.
33. Gisselbrecht C. Is there any role for transplantation in the Rituximab era for large B-cell lymphoma? *Hematology*. 2012.
34. Martín A, Conde E, Arnan M, Canales MA, Deben G, Sancho JM, et al. R-ESHAP as salvage therapy for patients with relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma: the influence of prior exposure to rituximab on outcome. A GEL/TAMO study. *Hematologica*. 2008;93(12).
35. Armitage JO. Clinically important variants of diffuse large B-cell lymphoma. *Transfus Apher Sci*. 2013;49(1):27-30.
36. Fowler N, Davis E. Targeting B-cell receptor signaling: changing the paradigm. *Hematology*. 2013.
37. Waibel M, Gregory G, Shortt J, Johnstone R. Rational combination therapies targeting survival signaling in aggressive B-cell leukemia/lymphoma. 2014.
38. Chustecka Z. Obinutuzumab for CLL, EU Approval Recommended. *Medscape Medical News*. 2014.
39. Feldman T, Mato AR, Chow KF, Protomastro EA, Yannotti KM, Bhattacharyya P, et al. Addition of lenalidomide to rituximab, ifosfamide, carboplatin, etoposide (RICER) in first-relapse/primary refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2014.